

神経栄養因子遺伝子導入網膜色素上皮細胞移植による局所的, 全身的反応と光傷害に対する視細胞保護効果に関する研究

著者	西郷 陽子
号	2197
発行年	2005
URL	http://hdl.handle.net/10097/22779

氏 名（本籍）	さい 西	ごう 郷	よう 陽	こ 子
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 博 第 2 1 9 7 号			
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻			
学 位 論 文 題 目	神経栄養因子遺伝子導入網膜色素上皮細胞移植による局所的，全身的反応と光傷害に対する視細胞保護効果に関する研究			

（主 査）

論文審査委員	教授 玉 井	信	教授 貫 和 敏 博
	教授 近 藤 尚 武		

論文内容要旨

近年、網膜疾患に対し新たな治療法として細胞移植が行われているが、視力の改善は必ずしも満足のできるものではない。一方、神経栄養因子は視細胞保護効果があることが知られている。そこで我々は神経栄養因子遺伝子導入細胞を作製後、網膜下に移植し、その影響と効果を検討した。

神経栄養因子として Axokine, 脳由来神経栄養因子 (BDNF), 塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) を, レポーター遺伝子として enhanced green fluorescent protein (eGFP) の cDNA をリポフェクション法でラット網膜色素上皮細胞 (RPE) に導入し, ベクターの導入を蛍光顕微鏡で確認した。また, 導入 RPE での, それぞれの因子遺伝子の発現を RT-PCR, real-time PCR で確認した。さらに, それぞれの神経栄養因子の発現の程度を Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) でも測定した。ベクターのみ導入の RPE と比べ, 神経栄養因子遺伝子導入 RPE ではそれぞれの神経栄養因子の発現増大が見られた。神経栄養因子遺伝子導入が, 導入された RPE の主要組織適合抗原 MHC- I と MHC- II の発現に及ぼす影響を real-time PCR にて検討した。BDNF 遺伝子の RPE への導入は MHC- I も MHC- II の発現も誘発しないと考えられた。一方, Axokine 遺伝子導入 RPE では, RPE の MHC- I の発現が増加し, bFGF 遺伝子導入 RPE では MHC- II の発現が軽度上昇した。

また, それぞれの神経栄養因子遺伝子導入 RPE 移植後 7 日目に眼球を固定し, 網膜-脈絡膜-強膜のフラットマウントを作製し, 蛍光顕微鏡にて eGFP の蛍光を同定し移植細胞の確認を行った。移植細胞の範囲を計測すると, 移植細胞の種類にかかわらず, 移植細胞の存在する領域の面積に有意な違いはないことを確認した。また網膜断層切片を作製し, 同様に蛍光顕微鏡で観察すると, 移植部位網膜下に蛍光で確認できる移植細胞が観察された。BDNF 遺伝子導入 RPE あるいは eGFP のみ導入の RPE 移植後 7 日目に, そのラットの網膜全体を回収して eGFP 陽性 RPE をフローサイトメーター (FACS) で回収し, real-time PCR にて測定すると, この BDNF 遺伝子導入 RPE 移植群では, eGFP ベクターのみ導入の RPE 移植群より約 2.2 倍多い BDNF 遺伝子の発現がみられ, 移植された網膜下で BDNF 遺伝子を発現していることが示された。

また, それぞれの RPE を網膜下に移植し, 1 週間後にそれぞれのラットより単核球を採取し CD8⁺ と CD4⁺ T 細胞の比率 (CD8⁺/CD4⁺) を比較した。Axokine 遺伝子導入 RPE 移植群の CD8⁺/CD4⁺ は, 他群に比べ統計学的に有意差はないものの大きい傾向がみられた。同様にそれぞれの RPE を網膜下に移植後, 血清を採取して移植細胞に対する反応を FACS にて測定した。Axokine 遺伝子導入 RPE 移植群のラット血清では, 他群に対して統計学的に有意な陽性反応が

みられた。それ以外の細胞移植ではコントロールと比較して差はなかった。これらより、BDNF 遺伝子導入 RPE は MHC 抗原の発現を誘発せず、移植後 7 日目まででは、宿主の抗体産生も誘発しない可能性が示された。

一方、遺伝子導入 RPE 移植後、連続光照射を 1 週間行い、光傷害モデルを作製し、そのラットの外顆粒層の厚さを測定することにより視細胞の保護効果も検討した。遺伝子非導入 RPE 移植は視細胞の光傷害を抑制すると考えられるものの、神経栄養因子を分泌する RPE 移植の方がその効果ははるかに大きかった。さらに、神経栄養因子の種類により視細胞の保護効果に違いがあり、それは特に、非移植領域の下方網膜で顕著であった。非移植領域の BDNF 遺伝子導入 RPE 移植群では他群にはみられない有意な視細胞保護効果が見られた。Axokine 遺伝子導入 RPE 移植の移植領域では視細胞保護効果がみられるものの、それ以外の非移植領域ではまったく効果が見られず、むしろ遺伝子非導入 RPE 移植よりも低い可能性が推測された。その効果は *in vitro* の結果や宿主の反応より、全身的、局所的免疫反応により影響される可能性が考えられた。

神経栄養因子遺伝子導入 RPE は移植後網膜下で、導入した神経栄養因子を分泌すること、Axokine 遺伝子導入 RPE 移植は、宿主の免疫反応を刺激する可能性があること、視細胞保護効果は非移植領域まで考慮すると BDNF が最も良好であることを示した。

審 査 結 果 の 要 旨

眼科学の急激な診断・治療法の進歩にもかかわらず、網膜疾患には依然として難治性のものが多く、視細胞変性による失明を防ぐことが出来ない。しかし基礎研究において細胞移植、特に神経栄養因子は視細胞保護効果があることが知られている。本研究は神経栄養因子遺伝子導入細胞を作製し、網膜下に移植し、その影響と保護効果を検討したものである。

神経栄養因子として Axokine、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) を、レポーター遺伝子として enhanced green fluorescent protein (eGFP) の cDNA をリポフェクション法でラット網膜色素上皮細胞 (RPE) に導入し、ベクターの導入を蛍光顕微鏡で確認、導入 RPE での、それぞれの因子遺伝子の発現を RT-PCR, real-time PCR で確認している。さらに、それぞれの神経栄養因子の発現の程度を Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) でも測定した。ベクターのみと比べ、神経栄養因子遺伝子導入 RPE ではそれぞれの神経栄養因子の発現増大が見られた。神経栄養因子遺伝子導入が、導入された RPE の主要組織適合抗原 MHC- I と MHC- II の発現に及ぼす影響を real-time PCR で検討し、BDNF の場合両者とも発現がみられなかったという。一方、Axokine の場合 MHC- I 分子発現が増加し、bFGF では MHC- II が軽度上昇したという。

また、それぞれの神経栄養因子遺伝子導入 RPE 移植後 7 日目に眼球を固定し、蛍光顕微鏡にて eGFP の蛍光を同定と移植細胞の確認と範囲に差が無いことを確認後、網膜断層切片で移植部位網膜下に移植細胞を観察している。BDNF 遺伝子導入 RPE あるいは eGFP のみ導入の RPE 移植後 7 日目に eGFP 陽性 RPE をフローサイトメーター (FACS) で回収し、real-time PCR にて測定、BDNF 遺伝子導入 RPE 移植群が、eGFP ベクター導入群より約 2.2 倍多い BDNF 遺伝子の発現を確認した。また移植個体の単核球を採取し CD8⁺ と CD4⁺ T 細胞の比率 (CD8⁺/CD4⁺) を比較し、Axokine 遺伝子導入群の CD8⁺/CD4⁺ は、他群に比べ大きく、BDNF 遺伝子導入 RPE は MHC 抗原の発現、宿主の抗体産生誘発がみられないことからもっとも安全であることを示した。一方、遺伝子導入 RPE 移植後、光傷害モデルの外顆粒層の厚さを測定することにより視細胞の保護効果も検討した。遺伝子非導入 RPE 移植に比べ導入 RPE 移植の方がその効果ははるかに大きく、特に、非移植領域の下方網膜で顕著で、非移植領域の BDNF 遺伝子導入 RPE 移植群では他群にはみられない有意な視細胞保護効果が見られた。以上の結果より神経栄養因子遺伝子導入 RPE は移植後網膜下で、導入した神経栄養因子を分泌すること、Axokine 遺伝子導入 RPE 移植は、宿主の免疫反応を刺激する可能性があること、視細胞保護効果は非移植領域まで考慮すると BDNF が最も良好であることを示した。

これらの結果は今後の移植医療の基礎的研究として大変重要であり、指摘された点も改変されており、博士論文として十分価値あると評価できる。

よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。